



# **EFECTO ANSIOLÍTICO DE LA ESTIMULACIÓN CEREBRAL PROFUNDA A CORTO PLAZO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

---

**Autora:** María Isabel Ardaya Franco

**Tutora académica:** Laura Pérez Caballero

**Fecha:** 23 de Junio del 2016

**Trabajo Fin de Grado**

**Curso 2015/2016**

**Grado en Psicología**

**Facultad de Ciencias de la Educación**

**Universidad de Cádiz**



## RESUMEN

Para solventar las limitaciones del tratamiento actual con respecto a la Depresión Mayor Resistente (DMR), se investigan estrategias terapéuticas alternativas. De entre ellas, la Estimulación Cerebral Profunda (ECP) muestra resultados muy prometedores. A partir de los estudios llevados a cabo queremos conocer si la ECP, además del efecto antidepresivo, puede inducir efecto ansiolítico en animales de experimentación a corto plazo.

**Método:** Para evaluar el efecto ansiolítico de la ECP en la corteza infralímbica se realizaron los siguientes test comportamentales *Open Field Test* (OFT), *Novelty Supressed Feeding Test* (NSFT) y *Home-Cage Emergence* (HCE) en animales de experimentación.

**Resultados:** La ECP no alteraba la actividad motora de los animales pero indujo un aumento en el tiempo de permanencia en la zona central en el OFT. En el NSFT, los resultados obtenidos no son concluyentes debido a que la ingesta de los animales se vio influida por el poco tiempo transcurrido tras la intervención quirúrgica. Por último, en el HCE se observó que la ECP producía una tendencia a escapar en menor tiempo.

**Conclusión:** La ECP a corto plazo en la corteza infralímbica no modifica la actividad locomotora de los animales y parece influir en los niveles de ansiedad de los animales de experimentación. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos complementarios para esclarecer la magnitud de su efecto.

**Palabras clave:** Estimulación Cerebral Profunda; Depresión Mayor Resistente; Estudio preclínico; efecto ansiolítico; Test comportamentales.

## **ABSTRACT**

In order to resolve the current treatment limitations regarding the Resistant Major Depression (RMD), alternative therapeutic strategies are investigated. Among them, the Deep Brain Stimulation (DBS) shows very promising results. Based on the previous studies carried out, we want to find out if the DBS, in addition to the antidepressant effect, may induce anxiolytic effect in experimentation animals in the short-term.

**Method:** To evaluate the DBS anxiolytic effect on the infralimbic cortex, several behavioural tests were done in experimental animals: Open Field Test (OFT), Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT) and Home-Cage Emergence (HCE).

**Results:** The DBS did not modify the animal's motor activity but it induced an increase in the OFT's central area term time. In the NSFT, the accomplished outcomes are not conclusive due to the animal's intake was influenced by the short time passed after the surgical intervention. Ultimately, it was observed that, the DBS produced a shorter time escape tendency in the HCE.

**Conclusion:** The short term DBS in the infralimbic cortex do not modify the animal's motor activity and seems to have an influence on the experimentation animal's anxiety levels. However, it would be mandatory to carry out complementary experiments to shed light about its effect magnitude.

**Key words:** Deep Brain Stimulation; Resistant Major Depression, Preclinical Study, anxiolytic effect; behaviour tests.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<i>Depresión Mayor Resistente .....</i>	<i>1</i>
<i>Estimulación Cerebral Profunda (ECP) .....</i>	<i>3</i>
<i>Estudios clínicos.....</i>	<i>4</i>
<i>Estudios preclínicos .....</i>	<i>6</i>
<i>Justificación del estudio .....</i>	<i>7</i>
<i>Objetivos e hipótesis de trabajo .....</i>	<i>8</i>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>8</b>
<i>Animales. ....</i>	<i>8</i>
<i>Implantación de los electrodos y procedimiento de estimulación. ....</i>	<i>8</i>
<i>Open Field Test (OFT). ....</i>	<i>9</i>
<i>Novelty Supressed Feeding Test (NSFT).....</i>	<i>10</i>
<i>Home-Cage Emergence Test (HCE). ....</i>	<i>10</i>
<i>Verificación histológica. ....</i>	<i>10</i>
<i>Visualización, verificaciones y montaje de las imágenes. ....</i>	<i>11</i>
<i>Análisis estadísticos. ....</i>	<i>11</i>
<i>Procedimiento del estudio. ....</i>	<i>12</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>
<i>Efecto de la ECP en el Open Field Test (OFT).....</i>	<i>13</i>
<i>Efecto de la ECP en el Novelty Supressed Feeding Test (NSFT). ....</i>	<i>17</i>
<i>Efecto de la ECP en el Home-Cage Emergence (HCE).....</i>	<i>19</i>
<i>Verificación histológica. ....</i>	<i>20</i>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>21</b>
<i>Discusión .....</i>	<i>21</i>
<i>Interés científico-social y utilidad del estudio .....</i>	<i>24</i>

<i>Limitaciones</i> .....	25
---------------------------	----

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>
-----------------------------------------	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Modelo neurobiológico de la de Depresión Mayor (Koppell, Greenberg y Rezai, 2004).....	2
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

<i>Figura 2.</i> Cronología del procedimiento experimental. ....	12
------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 3.</i> Efecto de la ECP en la distancia total recorrida expresada en unidades arbitrarias durante los 15 minutos del OFT.....	13
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 4.</i> Efecto de la ECP en la actividad motora a lo largo del tiempo en el OFT. ....	14
------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 5.</i> Efecto de la ECP en la permanencia total en la zona central del OFT.....	15
-------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 6.</i> Efecto de la ECP en la permanencia en la zona central a lo largo del tiempo en el OFT. ....	16
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 7.</i> Efecto de la ECP en el número de entradas totales a la zona central en el OFT. ....	17
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 8.</i> Efecto de la ECP en la latencia de ingesta de los animales en el NSFT. ....	17
----------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 10.</i> Efecto de la ECP en los gramos de comida ingerida tras la realización del NSFT. ....	19
--------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 11.</i> Efecto de la ECP en la latencia de escape en el HCE. ....	20
-----------------------------------------------------------------------------	----

<i>Figura 12.</i> Imágenes representativas del área de implantación del grupo DBS-off (A) y del grupo DBS-on (B).. ....	20
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Resumen de los estudios llevados realizados según la zona diana de implantación</i> .....	5
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

## INTRODUCCIÓN

### *Depresión Mayor Resistente*

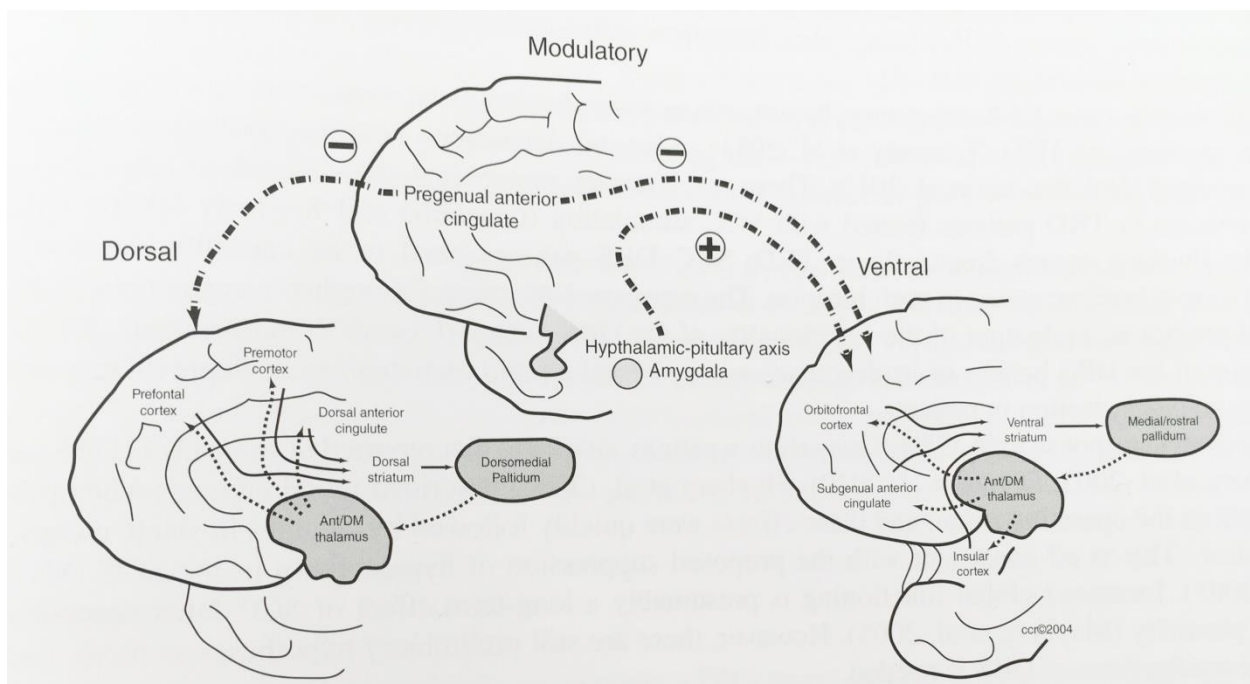
La Depresión Mayor es uno de los trastornos mentales más frecuentes a nivel global y se calcula que es la principal causa de discapacidad mundial (OMS, 2016). La prevalencia de este trastorno se sitúa en torno al 10% de la población y se estima que entre el 15 y el 20% de personas sufrirá un episodio de depresión a lo largo de su vida (Kessler et al., 2005). Además, se prevé que será la principal enfermedad mental en 2030 (Murray y López, 1997). Pero aún más alarmante es que entre el 30% y el 40% de personas que sufren esta patología, no responden al primer abordaje terapéutico, y entre un 5% y un 10% no responden a ningún tratamiento o combinación de éstos (Rush et al., 2006). Nos situamos en una situación crítica, debido al impacto que genera la Depresión Mayor a la persona que lo padece. Entre las características más perjudiciales encontramos el estado de ánimo depresivo, la anhedonia, la inactividad motora, alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, deterioro de las relaciones sociales y, los pensamientos y conductas suicidas, entre otras. Un aspecto añadido son los cuadros psicopatológicos que suelen discurrir junto a este trastorno. De entre ellos, los Trastornos de Ansiedad presentan una elevada asociación con los casos de Depresión Mayor, encontrándose una alta comorbilidad entre las dos psicopatologías (Clark y Watson, 1991; Agudelo, Buela-Casal y Spielberger, 2007). Debemos valorar el cuadro de ansiedad comórbido, ya que sin duda, puede agravar la sintomatología depresiva primaria (Aragonès, Piñol y Labad, 2009; Rush et al., 2005; McDermut, Mattia y Zimmermen, 2001). En los casos de Depresión Mayor Resistente (DMR) se debe tener más en cuenta estos problemas asociados. Un cuadro de ansiedad comórbido puede dificultar u obstaculizar el correcto desarrollo del tratamiento y la evolución del paciente con Depresión Mayor (Aragonès et al., 2009; Rush et al., 2005; McDermut et al., 2001). De aquí que sea necesario valorar, junto a la sintomatología depresiva, cuadros asociados como el Trastorno de Ansiedad.

Además del deterioro de la calidad de vida de la persona, la Depresión Mayor conlleva un gasto económico elevado en las entidades públicas de salud (Roldán-Garrido y Llanos-Méndez, 2010). A raíz de estos alarmantes datos sobre el impacto que causa la Depresión Mayor en la vida de la persona y en la sociedad, se han venido desarrollando investigaciones para comprender la problemática a la que nos estamos enfrentando.

Desde que se demostró que en la Depresión Mayor se producen alteraciones funcionales y neuroquímicas en determinadas estructuras se han estudiado las áreas

implicadas en la manifestación de la sintomatología depresiva a través de técnicas de neuroimagen funcional (Mayberg et al., 1997; Kopell, Greenberg y Rezai, 2004). Uno de los modelos neurobiológicos que ha recibido más atención es el de Kopell et al. (2004), donde proponen que las alteraciones implicadas en la sintomatología depresiva corresponden con las regiones dorsal, ventral y frontal del cerebro (Figura 1). Los síntomas cognitivos de la Depresión se producen por las alteraciones en la vía dorsal, mientras que el estado afectivo es producto de la vía ventral (Puigdemont, Portella, Molet y Pérez, 2012). Por último, la vía frontal modula la acción conjunta de estas dos vías anteriores (Prosée y Denys, 2015).

Las alteraciones identificadas en la mayoría de estudios se producen en el área subcallosa del cíngulo (Cg25), el córtex orbitofrontal, el córtex prefrontal dorsolateral, la amígdala y el hipocampo, observándose una interacción inversa entre el aumento de flujo sanguíneo del área Cg25 y la disminución en regiones del neocórtex (principalmente, el lóbulo prefrontal dorsolateral derecho y el lóbulo parietal inferior) (Mayberg et al., 1999; Puigdemont et al., 2012).



*Figura 1.* Modelo neurobiológico de la de Depresión Mayor (Kopell et al., 2004).

Teniendo en cuenta que existen áreas funcionalmente alteradas en Depresión Mayor (inhibidas o hiperactivadas) y que existe un elevado porcentaje de casos resistentes, surgen las técnicas de neuroestimulación como intervenciones alternativas en el tratamiento de los casos resistentes. En la actualidad, las terapias farmacológicas y psicológicas son las intervenciones

de primera elección. Cuando los pacientes no responden a esta primera línea, se recurre a fármacos alternativos u otras técnicas, como la terapia electroconvulsiva, la estimulación magnética transcraneal o la estimulación del nervio vago. Sin embargo, entre el 5% y el 10% de los pacientes sigue sin responder a estos tratamientos (Rush et al., 2006). Debido a este alto porcentaje, se están llevando a cabo numerosas investigaciones para encontrar técnicas que sean útiles en los casos resistentes al tratamiento (Akhar, Bukhari, Nazir, Anwar y Shahzad, 2016). De entre las técnicas estudiadas, la Estimulación Cerebral Profunda (ECP) se postula como una de las técnicas alternativas más prometedoras en el tratamiento de la DMR.

### *Estimulación Cerebral Profunda (ECP)*

La ECP es una técnica de estimulación invasiva que implica la implantación de unos electrodos en diferentes zonas cerebrales, con el fin de modular la actividad de estas áreas que presentan una actividad anómala en una patología concreta. El mecanismo eléctrico (neuroestimulador) funciona gracias a un dispositivo que se coloca normalmente, en la zona clavicular y manda los impulsos eléctricos a los electrodos para que ejerzan su influencia en la zona diana. La ECP se utiliza en personas con la enfermedad de Parkinson, Temblor esencial, Distonia y Trastorno Obsesivo Compulsivo como protocolo aprobado por la Food and Drug Administration (FDA). Es más, actualmente se utiliza de manera rutinaria en Europa y en España como protocolo en diversas patologías motoras. Además, se encuentra en fase de estudio para el tratamiento de la Epilepsia, el Dolor crónico y Trastornos psiquiátricos, como el Trastorno de Esquizofrenia, el Trastorno Bipolar, la Anorexia Nerviosa, el Síndrome de Tourette, el Trastorno de Estrés Post-Traumático, el comportamiento agresivo, enfermedad de Alzheimer, y la Depresión Mayor (Prosée y Denys, 2015; Roldán-Garrido y Llanos-Méndez, 2010).

Sin embargo, desconocemos los mecanismos por los que esta técnica es eficaz en casos que no responden a ningún otro tratamiento. Debemos tener en cuenta que en la eficacia de la ECP median distintos factores, como la estructura cerebral estimulada, la patología que estemos tratando, los parámetros de estimulación y la citoarquitectura de la estructura estimulada (Benabid et al., 2000). A partir de estos elementos se han descrito distintas hipótesis sobre el mecanismo de acción de la ECP. En primer lugar, se postula que crea un efecto inhibitorio en estructuras ricas en cuerpos celulares, mientras que produce efecto excitatorio en estructuras donde predominan los haces nerviosos (Dostrovsky, Levy, Wu, Hutchison, Tasker y Lozano, 2000; Urbano, Leznik y Llinas, 2002; Benabid et al., 2005;



McIntyre, Grill, Sherman y Thakor, 2004). La segunda hipótesis que encontramos es la resintonización de un patrón funcional anómalo, es decir, modifica transmisiones neuronales alteradas (Montgomery y Baker, 2000). La tercera hipótesis es el efecto *jamming* o “ruido de fondo”, donde la ECP actuaría interrumpiendo patrones de funcionamiento anormales y mejorando el flujo de información en las vías neuronales (García, Audin, D’Alessandro, Bioulac y Hammond, 2003; Hashimoto, Elder, Okun, Patrick y Vitek, 2003). A medida que avanzan las investigaciones, surgen nuevas explicaciones del mecanismo que subyace a la ECP, aunque las hipótesis con mayor respaldo son las mencionadas anteriormente.

Como tratamiento, la ECP se usa en casos de Depresión Mayor cuando los pacientes no presentan una respuesta terapéutica satisfactoria a ninguno de los tratamientos disponibles actualmente, administrados en la dosis y tiempo adecuado. No todos los pacientes con DMR son adecuados para la ECP, por lo que se lleva a cabo una fase de selección de los individuos que puedan ser beneficiados por la técnica.

### *Estudios clínicos*

El primer ensayo clínico llevado a cabo en 2005, estudió la eficacia de la ECP en el área Cg25 en un grupo de seis personas diagnosticadas de DMR (Mayberg et al., 2005). Esta área cerebral fue elegida porque años atrás, el mismo grupo de investigación descubrió que esta zona se encontraba hiperactivada metabólicamente en personas con Depresión Mayor y tras la respuesta al tratamiento su actividad se normalizaba (Mayberg et al., 1997; Mayberg et al., 1999). Sin embargo, observaron que las personas que no respondían al tratamiento seguían presentando esta alteración metabólica en la Cg25 (Mayberg et al., 1997; Mayberg et al., 1999). Los resultados del primer ensayo clínico realizado fueron sorprendentes, ya que cuatro de las seis personas con DMR respondían a la ECP a los 6 meses de la neurocirugía (Mayberg et al., 2005). Más tarde, el mismo grupo de investigación (Lozano, Mayberg, Giacobbe, Hamani, Craddock y Kennedy, 2008), amplió el ensayo clínico hasta veinte pacientes. Los resultados de esta investigación fueron de un 60% de respuesta y un 35% de remisión a los 6 meses del tratamiento, siendo un 55% y 35%, de respuesta y remisión respectivamente, a los 12 meses (Lozano et al., 2008). Este mismo grupo de investigación, realizó años después una investigación longitudinal del efecto de la ECP, observando que la respuesta terapéutica se mantenía hasta años después (Kennedy et al., 2011). Otro estudio de un grupo de investigación diferente (Puigdemont et al., 2012), corroboró la eficacia de esta

técnica en la Cg25 encontrando que un 62,5% de los pacientes intervenidos respondían satisfactoriamente y un 50% alcanzaron la remisión de la sintomatología a los 12 meses.

Destacar que la respuesta terapéutica inducida por la ECP en estos ensayos clínicos se produce al poco tiempo tras el inicio de la ECP (Mayberg et al., 2005; Lozano et al., 2008; Puigdemont et al., 2012). Este hecho es de real importancia para el tratamiento de pacientes con DMR, debido a la situación en la que se encuentran, la evolución crónica de la patología y el elevado riesgo de suicidio que presentan (Ayuso-Mateos et al., 2012).

Asimismo, la técnica ha sido probada en otras zonas cerebrales (Tabla 1), siendo también efectiva en el área habénula lateral (e. g., Sartorius et al., 2010), el pedúnculo inferior del tálamo (e. g., Jiménez et al., 2005), el núcleo accumbens (e. g., Bewernick et al., 2010; Bewernick, Kayser, Sturm y Schlaepfer, 2012) y la cápsula ventral/estriado ventral (e. g., Malone et al., 2009). Sin embargo, revisiones recientes muestran que el área Cg25 es la zona con mejores resultados antidepressivos encontrados en el tratamiento con ECP en humanos (e. g., Udupa y Chen, 2015).

Tabla 1  
*Resumen de los estudios llevados realizados según la zona diana de implantación.*

Área de implantación de la ECP	Estudio	Porcentaje de respuesta de los pacientes (según escala HAMD)	Número de pacientes	Seguimiento (meses)
Área subcallosa del cíngulo (Cg25)	Mayberg et al., 2005	66.6	6	6
	Lozano et al., 2008	55	20	12
	Kennedy et al., 2011	64.3	20	72
	Puigdemont et al., 2012	62.5	8	12
	Lozano et al., 2012	29	21	12
	Holtzheimer et al., 2012	92	10	24
	Merkel et al., 2013	33	6	9
	Acolla et al., 2016	20	5	24
Cápsula ventral	Malone et al., 2009	53.3	15	6-51
	Dougherty et al., 2014	23.3	30	24
	Bergfeld et al., 2016	40	25	~12-13
Núcleo accumbens	Bewernick et al, 2010	50	10	12
	Bewernick et a., 2012	45	11	48
Pedúnculo inferior del tálamo	Jimenez et al. 2005	*	1	24
Área habénula lateral	Sartorius et al., 2010	*	1	~14-15

\* Las investigaciones correspondientes al pedúnculo del inferior del tálamo y el área habénula lateral son diseños experimentales de caso único. No se incluye el porcentaje de respuesta al tratamiento en estos casos.

### *Estudios preclínicos*

A raíz de observar los resultados en los estudios clínicos, distintos investigadores comenzaron a estudiar el mecanismo de acción por el que la ECP en la Cg25 era efectiva en casos donde otros tratamientos no lo son. La corteza infralímbica, situada en la corteza ventromedial (vmPFC), es la zona de los roedores con mayor homología a la Cg25 en humanos (Gabbott, Warner, Jays y Bacon, 2003; Takagishi y Chiba, 1991), por lo que muchas investigaciones preclínicas han dirigido su atención a esta área. Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que la ECP en la corteza infralímbica tiene efecto antidepressivo en varios modelos animales de depresión (e. g., Jiménez-Sánchez et al., 2016; Bambinco et al., 2015; Veerakumar et al., 2014; Gersner, Toth, Isserles y Zangen, 2010; Rea et al., 2014; Edemann-Callesen et al., 2015).

Se ha demostrado el efecto antidepressivo en animales tratados con ECP mediante el *Forced Swimming Test* (Hamani et al., 2010; Gersner et al., 2010; Rea et al., 2014; Hamani et al., 2014; Jiménez-Sánchez et al., 2015; Edemann-Callesen et al., 2015; Lim et al., 2015a; Etiévant et al., 2015), incluso en modelos de depresión animal como el *Chronic Unpredictable Stress* (Gersner et al., 2010; Hamani et al., 2012; Lim et al., 2015b; Bambico et al., 2015), el modelo de derrota social (Veerakumar et al., 2014), el modelo inducido por la extracción de los bulbos olfatorios (Jiménez-Sánchez et al., 2016) y el modelo genético de las ratas Flinders (Rea et al., 2014; Edemann-Callesen et al., 2015). Además, se ha comprobado que la ECP produce efecto anti-anhedónico mediante el test de consumo de sacarosa (Hamani et al., 2010; Gersner et al., 2010; Hamani et al., 2012; Rea et al., 2014; Lim et al., 2015a; Lim et al., 2015b; Edemann-Callesen et al., 2015; Jiménez-Saánchez et al., 2016) y en el paradigma de autoestimulación eléctrica intracraneal (Rea et al., 2014; Edemann-Callesen et al., 2015).

Cabe destacar, que el efecto descrito por estos estudios preclínicos, indican que la ECP en la corteza infralímbica es efectiva tanto en protocolos de estimulación crónicos (Hamani et al., 2012; Rea et al., 2014; Bambico et al., 2015; Lim et al., 2015b) como en protocolos cortos de estimulación (Hamani et al., 2014; Pérez-Caballero et al., 2014, Jiménez-Sánchez et al., 2015; Etiévant et al., 2015; Lim et al., 2015a; Jiménez-Sánchez et al., 2016). Dada la problemática a la que se enfrentan los pacientes que sufren de DMR, es de vital relevancia que la respuesta terapéutica producida por la ECP sea lo más rápida posible con el fin de mejorar el pronóstico de los pacientes y acortar el tiempo en el que el tratamiento aún no

posee efecto terapéutico, disminuyendo la probabilidad de llevar a cabo conductas suicidas en este periodo (Ayuso-Mateos et al., 2012).

Unido al efecto antidepresivo y anti-anhedónico, se ha estudiado los efectos de la ECP en otros aspectos de la sintomatología depresiva, como la interacción social (Veerakumar et al., 2014) y déficits cognitivos, como la alteración en la memoria (Gersner et al., 2010).

Debido a la alta comorbilidad entre la Depresión Mayor y los Trastornos de Ansiedad (Clark y Watson, 1991; Agudelo, Buena-Casal y Spielberger, 2007), también se ha investigado cómo la ECP afecta a los niveles de ansiedad de los animales de experimentación. Es muy importante valorar este aspecto, ya que los Trastornos de Ansiedad obstaculizan el adecuado tratamiento de la DMR (Aragonès et al., 2009; Rush et al., 2005; McDermut et al., 2001). En roedores, el efecto ansiolítico de la ECP ha sido evaluado en el test *Home-Cage Emergence* (Lim et al., 2015b), *Elevated Plus Maze* (Bambico et al., 2015) y en el *Novelty Suppressed Feeding Test* (Hamani et al., 2010; Bambico et al., 2015; Jiménez-Sánchez et al., 2015).

### *Justificación del estudio*

Son numerosos los estudios llevados a cabo para comprobar la eficacia y el mecanismo de acción de la ECP tanto en humanos como en animales de experimentación. Debido a los resultados encontrados tanto en estudios clínicos como preclínicos, la ECP se propone como una técnica alternativa muy prometedora para los casos de DMR. Es necesaria la investigación de los mecanismos involucrados en la ECP con el fin de poder mejorar los porcentajes de respuesta y remisión en los pacientes.

En el presente trabajo nos centraremos en el estudio de la ECP en animales, tomando como zona diana de la implantación de los electrodos la corteza ventromedial (vmPFC), concretamente el área infralímbica. Estudios previos del grupo de investigación de Neuropsicofarmacología y Psicobiología de la Universidad de Cádiz indican que un protocolo corto de ECP en la corteza infralímbica produce un efecto antidepresivo en animales de experimentación (Pérez-Caballero et al., 2014). A raíz de estas investigaciones nos planteamos estudiar si la ECP a corto plazo también induce efecto ansiolítico. Para ello, se utiliza una batería de test comportamentales para evaluar los niveles de ansiedad de los animales.

### *Objetivos e hipótesis de trabajo*

El objetivo principal de este estudio es comprobar si un protocolo corto de ECP produce un efecto ansiolítico en animales de experimentación. Para ello, se registró la conducta de los roedores en diferentes test comportamentales que evalúan los niveles de ansiedad.

Las hipótesis de trabajo elaboradas para comprobar el objetivo general son:

- Un protocolo corto de ECP en la corteza infralímbica no produce alteraciones en la actividad locomotora en roedores.
- El protocolo corto de ECP en la corteza infralímbica es capaz de disminuir los niveles de ansiedad en animales de experimentación.

## **MÉTODO**

### *Animales*

El experimento se realizó con 70 ratas macho adultas de la cepa Wistar, con 8 semanas y peso entre 250 y 350 gramos al inicio del estudio. Se encontraban bajo condiciones estándar de laboratorio durante todo el experimento (temperatura e  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa de  $55 \pm 10\%$ , ciclo de luz-oscuridad de 12h, agua y comida ad libitum). Los procedimientos de manipulación de animales se regularon según la normativa 2010/63/EU del Comité Europeo y el Real Decreto 53/2013 de la Legislación Española. Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité para la Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz.

### *Implantación de los electrodos y procedimiento de estimulación*

Se anestesiaron los animales con una combinación de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg), vía intraperitoneal. Se colocaron en el aparato de esterotáxia (David Kopf, mod. 900) utilizado para la neurocirugía, donde se asegura la inmovilidad de la cabeza. Se realiza una apertura de la piel que recubre el cráneo para exponer las suturas craneales, las cuales se usaron como referencia para ubicar las coordenadas. La ubicación es seleccionada a partir del Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1997), usando bregma y duramadre como referencias.

A los animales que fueron operados se les implantaron los electrodos de forma bilateral, en el área infralímbica que forma parte de la corteza ventromedial (vmPFC) (AP +3.2, L  $\pm$ 0.5, DV 4.3mm). Para realizar los orificios en el cráneo se utilizó una fresa de acero redondeada acoplada a un micromotor (Microman 250, Namrol, España). Se abrieron cinco orificios, tres de ellos para introducir tres tornillos quirúrgicos de acero inoxidable (FST, Fine Science Tools), para posteriormente asegurar la fijación del cemento dental. Los dos restantes se realizaron en las coordenadas indicadas para la introducción de los electrodos. Después de realizar las perforaciones, se retiraron las meninges de los orificios donde se introducirían los electrodos, para permitir su paso hasta llegar a la profundidad correspondiente a la zona diana.

Los electrodos estaban compuestos por dos cables, aislados el uno del otro mediante aislante de esmalte (Nylon y HFV). Los cables de acero inoxidable que forman el electrodo, poseen un diámetro de 150  $\mu$ m y una separación entre ellos de 100  $\mu$ m (California Fine Wire, Grover Beach, CA).

El estimulación fue generada y controlada mediante un estimulador (CIBERTEC CS-220, España) conectado a una unidad de aislamiento (CIBERTEC Isu-165, España). El protocolo de estimulación utilizado fueron pulsos de 90  $\mu$ sec de duración, con una frecuencia de 130 Hz y una intensidad de 100  $\mu$ A. Los animales con ECP recibieron estimulación durante 4 horas el día previo a los tests comportamentales y 2 horas el mismo día de las pruebas.

#### *Open Field Test (OFT)*

El *Open Field Test*, también conocido como el test de campo abierto, consiste en introducir al animal a una caja de metacrilato transparente (45x45x35 cm), y dejarlo explorar libremente con el fin de evaluar la actividad motora. Para ello se utilizó un sistema digital llamado S.M.A.R.T (Spontaneous Motor Activity Recording and Tracking; PanLab, S.L., Spain). Se colocó una cámara de grabación en el techo del box de experimentación y el comportamiento de los animales era analizado simultáneamente en el sistema S.M.A.R.T.. Se distinguió una zona central (15x15 cm) dentro de la caja de experimentación, dibujando el área en la imagen que recibía el programa digital. El sistema S.M.A.R.T. capta las variaciones que se produce en la imagen y nos permite evaluar distintos parámetros como la distancia total recorrida (en unidades arbitrarias), número de veces que entra a la parte central de la caja, latencia en entrar a esta zona central, etc. Se evaluó el comportamiento durante 15

minutos y se analizó el comportamiento durante la totalidad del tiempo y en periodos de 5 minutos.

#### *Novelty Supressed Feeding Test (NSFT)*

El *Novelty Supressed Feeding Test*, es una prueba en la que los animales son expuestos a un entorno nuevo, una caja de plexiglás (100 cm× 100 cm× 40 cm). 24 horas antes de realizar el test, se quita la comida y el agua a los animales. En la caja se introduce una plataforma con comida (pellets) en la zona central. Los animales en situaciones naturales tienden a permanecer en los límites del lugar, resguardándose de exponerse al campo abierto (Radcliffe, Jones y Erwin, 1998; Leussis y Bolivar, 2006). El entorno nuevo es fuente de ansiedad para el roedor, por lo que tenderá a evitar las zonas centrales (Leussis y Bolivar, 2006). Los parámetros que se evaluaron fueron el tiempo que tardan en ingerir la comida (sin tener en cuenta cuando olfateaban) y el número de veces que se acercaban a la plataforma antes de comer. Una vez los animales comían o tras un tiempo máximo de 10 minutos, los animales eran devueltos a su caja y se contabilizó la ingesta de comida durante los siguientes 15 minutos. La realización de la prueba fue grabada mediante una cámara de vídeo para su posterior análisis.

#### *Home-Cage Emergence Test (HCE)*

El *Home-Cage Emergence* es una prueba que consiste en quitar la rejilla de la caja en la que suele estar el roedor y colocar otra caja con rejilla al lado permitiendo así que este pueda escapar escalando por esta segunda. Se cronometra el tiempo, obteniendo una medida de la latencia de escape. El tiempo máximo del test es de 10 minutos, siendo ésta la puntuación máxima si el animal no escapa.

#### *Verificación histológica*

Tras la realización de los test comportamentales, se procedió a realizar la verificación histológica para comprobar que los electrodos estaban implantados en la corteza infralímbica. Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg, vía intraperitoneal) y sacrificados para extraer el cerebro en fresco. El encéfalo fue introducido en un recipiente que contiene líquido fijador (paraformaldehído al 4%) durante 72 horas, para conservar el tejido

en el mejor estado posible. Tras la fijación, se pasa a otro recipiente que contiene sacarosa al 30% en tampón fosfato (PB) 0.4 M.

Para obtener el área de interés, se cortaron secciones coronales seriadas de 40  $\mu$ m, mediante el uso de un microtomo (Microm HM 430, Thermo Scientific, Waltham, MA) equipado con una unidad de congelación (Microm KS34 Thermo Scientific, Waltham, MA). Los cortes se guardaron en eppendorff que contenían crioprotector (sacarosa y etilenglicol al 30% en tampón fosfato (PB) 0.4M) para ser almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

Los cortes fueron montados en los portaobjetos y se realizó una tinción con rojo neutro con el fin de teñir los somas celulares. En primer lugar, se sumergen en el rojo neutro durante 2 minutos. Tras eliminar el exceso de colorante en cubetas con agua destilada, se deshidratan los cortes con una serie creciente de alcoholes (70%, 95% y 100%, consecutivamente). En cada recipiente se introducen los cortes durante 30 segundos. Por último, se sumergieron los portaobjetos en Xilol durante 2 minutos y transcurrido este tiempo, se coloca el cubreprotector en los portaobjetos, usando medio de montaje DPX.

#### *Visualización, verificaciones y montaje de las imágenes*

Los cortes obtenidos, que corresponden con la zona Infralímbica, fueron delimitados según el Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1997). Tras el proceso de tinción, el tejido fue examinado con un microscopio (Olympus BX60) mediante microscopía óptica de campo claro, acoplado a una cámara digital (Olympus DP71). Mediante la visualización en el microscopio se verificaban que la implantación de los electrodos estuviera en la zona diana. Aquellos animales que no tenían los electrodos implantados en el área infralímbica fueron descartados y se omitieron sus resultados en el análisis de datos. Se realizaron capturas de microfotografías con un aumento de 4X, para posteriormente convertirlas a imágenes en el programa Adobe Photoshop Elements (v. 2.0).

#### *Análisis estadísticos*

Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico Graph Prism (v. 5.0; GraphPad Software, Inc.). Se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) de una vía o de medidas repetidas. Además, se aplicó el test *post hoc* de Bonferroni para comparar los grupos experimentales entre sí. Los factores de



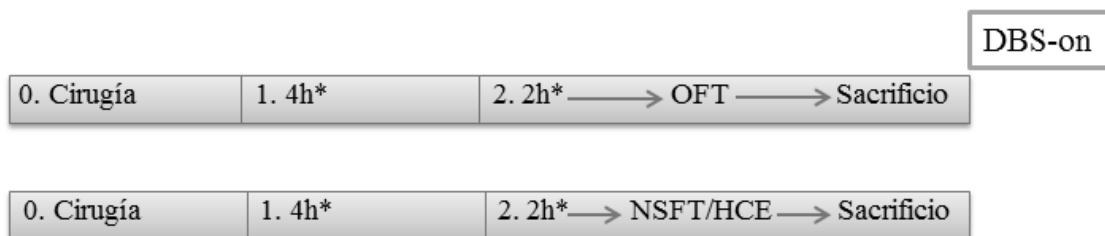
variación entre los grupos de estudio fueron la ECP y el tiempo. Se estableció el grado de significación en  $p < 0.05$ .

### *Procedimiento del estudio*

El protocolo de ECP fue de dos días (corto plazo) tras la neurocirugía. Fueron necesarios dos conjuntos de animales de cada grupo experimental para poder realizar todos los test comportamentales que nos propusimos para medir el efecto ansiolítico de la ECP. Los grupos experimentales son:

- Naïve: animal sin neurocirugía ni tratamiento farmacológico.
- DBS-off: animales con electrodos implantados en la corteza infralímbica, pero que no reciben ECP.
- DBS-on: animales donde se implantaron los electrodos en el área infralímbica y recibieron ECP. Este grupo era estimulado el primer día tras la operación durante 4 horas. Al siguiente día, recibían 2 horas de estimulación justo antes de realizar el test comportamental pertinente (Figura 2).

El primer conjunto de animales se cometió al OFT, mientras que el otro, realizó el NSFT y el HCE (Figura 2). El OFT tiene una duración de 10 minutos por cada animal, por lo tanto, organizamos el horario para que los animales entraran cada 15 minutos a la prueba, de forma individual. Este test comportamental se realizó dos días después de la cirugía, durante toda la mañana (10:00-14:00h). Al igual que el OFT, el NSFT se realizó dos días después de la operación y en horario de mañana. El HCE se realizó en grupos de 4 animales tras la realización del NSFT. Por último, se sacrificaban los animales cuando terminaban de realizar las pruebas para conservar el cerebro tal como se encontraban.



*Figura 2.* Cronología del procedimiento experimental. El total de los animales de experimentación fueron divididos en dos conjuntos para poder realizar todos los test comportamentales seleccionados. Ambos conjuntos se distribuyeron en 3 grupos de experimentación: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. Los animales DBS-on recibieron estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. Los grupos Naïve y DBS-off,

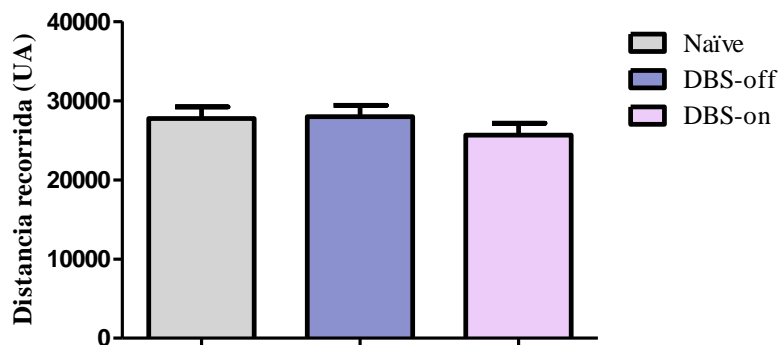
realizaron el mismo procedimiento, a excepción de las horas de estimulación. Un conjunto realizó el OFT, mientras que el otro realizó el NSFT y el HCE. Tras la realización de los test comportamentales, los animales operados fueron anestesiados y sacrificados para la verificación. \* Estimulación.

Con respecto a las variables contaminantes del experimento, los animales se encontraban constantemente bajo las mismas condiciones ambientales (comentadas anteriormente en el subapartado de animales) y genéticas, reduciendo así considerablemente la variabilidad en los resultados.

## RESULTADOS

### *Efecto de la ECP en el Open Field Test (OFT)*

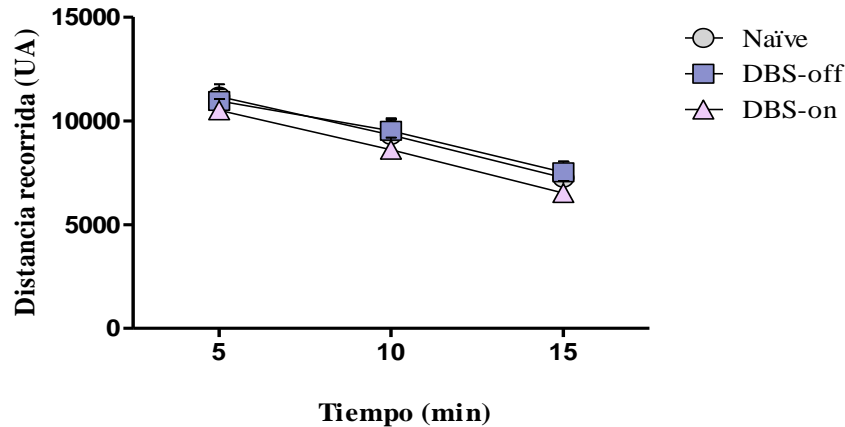
Con el OFT se evaluó si la ECP produce alteración en la actividad locomotora de los animales. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en la distancia total recorrida durante los 15 minutos de duración del test (ANOVA de una vía:  $F_{(2,26)} = 0.71$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 3).



*Figura 3.* Efecto de la ECP en la distancia total recorrida expresada en unidades arbitrarias durante los 15 minutos del OFT. Los grupos experimentales fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. El OFT se realizó 48 horas después de la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM ( $n=8-10$  animales por grupo).

La duración total del OFT se fragmentó en periodos de 5 minutos para observar si variaba la distancia recorrida a lo largo del tiempo. Los resultados encontrados muestran un cambio significativo a lo largo del tiempo, pero no se encuentran diferencias significativa en

el factor ECP ni en la interacción entre ambos factores (ANOVA de medidas repetidas: tiempo,  $F_{(2,48)} = 63.10$ ,  $p < 0.001$ ; ECP,  $F_{(2,48)} = 0.71$ ,  $p > 0.05$ ; Interacción,  $F_{(4,48)} = 0.15$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 4). El posterior análisis *post-hoc* de Bonferroni no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los puntos temporales ( $p > 0.05$ ).



*Figura 4.* Efecto de la ECP en la actividad motora a lo largo del tiempo en el OFT. La distancia total recorrida está expresada en unidades arbitrarias, y fragmentada en periodos de 5 minutos durante el OFT. Los grupos experimentales fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. El OFT se realizó 48 horas después de realizar la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=8-10 animales por grupo).

Además de la distancia recorrida, evaluamos la permanencia en la zona de central de todos animales. Como se comentó en la descripción del OFT, los roedores tenderán por naturaleza a evitar la zona central de la caja (Radcliffe et al., 1998; Leussis y Bolivar, 2006). Por lo tanto la permanencia en ella, puede aportarnos datos sobre el nivel de ansiedad (Leussis y Bolivar, 2006). Los datos encontrados muestran diferencias significativas en el tiempo de permanencia en la zona central (ANOVA de una vía:  $F_{(2,26)} = 4.80$ ,  $p < 0.05$ ; Figura 5).

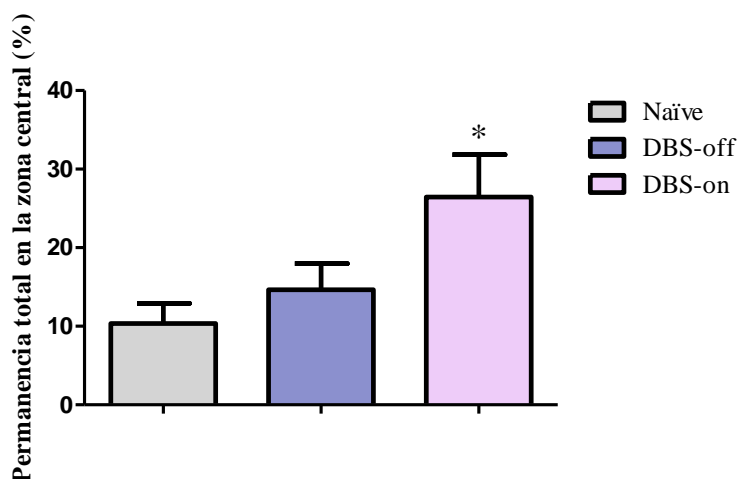
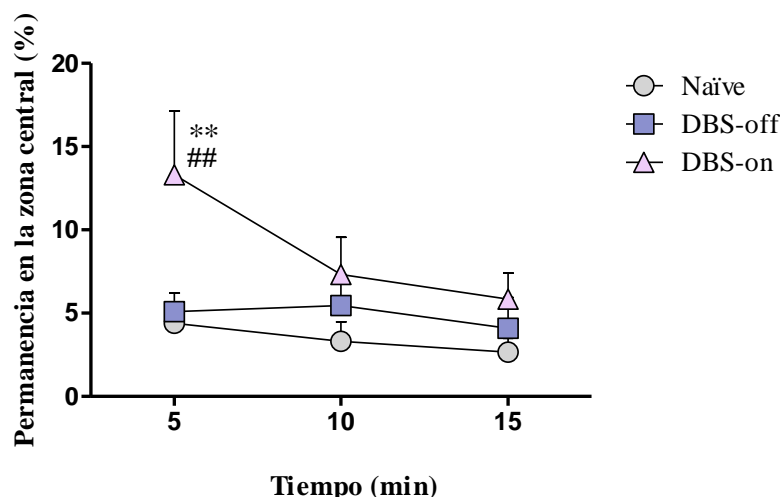


Figura 5. Efecto de la ECP en la permanencia total en la zona central del OFT. La zona central fue delimitada usando el programa S. M. A. R. T., con el cual obteníamos datos sobre la permanencia en esta zona, expresados en porcentaje (%). La permanencia total en la zona central fue medida durante los 15 minutos de duración del OFT. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. El OFT se realizó 48 horas después de realizar la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=8-10 animales por grupo). \*  $p < 0.05$  vs Naïve.

El test *post hoc* de Bonferroni mostró que los animales DBS-on permanecían más tiempo en la zona central que los animales Naïve ( $p < 0.05$ ). El porcentaje promedio de la permanencia total en el grupo Naïve fue de 10.36%, mientras que en los animales DBS-on fue de 26.46%, es decir, aproximadamente 2 veces mayor. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el grupo Naïve y el DBS-off ( $p > 0.05$ ), ni entre el grupo DBS-off y DBS-on ( $p > 0.05$ ).

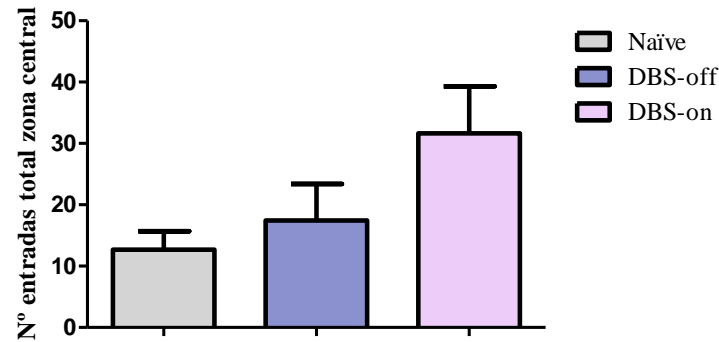
Al analizar el comportamiento de los animales en el OFT en fragmentos de 5 minutos de duración, obtenemos diferencias significativas en la permanencia de la zona central en el factor tiempo y en el factor ECP, sin observar significancia en la interacción entre ambos (ANOVA de medidas repetidas: tiempo,  $F_{(2,48)} = 3.45$ ,  $p < 0.05$ ; ECP,  $F_{(2,48)} = 4.80$ ,  $p < 0.05$ ; Interacción,  $F_{(4,48)} = 1.44$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 6).



*Figura 6.* Efecto de la ECP en la permanencia en la zona central a lo largo del tiempo en el OFT. La zona central fue delimitada usando el programa S. M. A. R. T., con el cual obteníamos datos sobre la permanencia en esta zona, expresados en porcentaje (%). La duración total de la prueba, fue dividida en periodos de 5 minutos para observar si se modificaba la permanencia en la zona central a lo largo del tiempo. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. El OFT se realizó 48 horas después de la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=8-10 animales por grupo). \*\*  $p < 0.01$  vs. Naïve, ##  $p < 0.01$  vs. DBS-off.

El test post-hoc de Bonferroni reveló que la ECP causaba un aumento en el tiempo de permanencia en la zona central solo durante los primeros 5 minutos comparado con los animales Naïve ( $p < 0.01$ ) y con los animales DBS-off ( $p < 0.01$ ). El porcentaje de tiempo promedio en el grupo Naïve es de 4.38%, siendo en los animales DBS-on de 13.30% del tiempo, es decir, aproximadamente 3 veces más que el grupo Naïve. Con respecto al resto del tiempo, no se encuentran diferencias significativas entre los grupos experimentales.

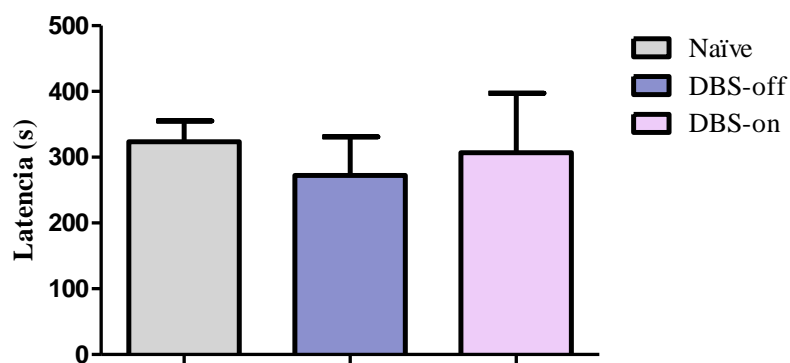
Por último, los datos muestran que no existen diferencias significativas con respecto al número de veces que entran los animales a la zona central (ANOVA de una vía:  $F_{(2,26)} = 3.02$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 7). Sin embargo, observamos una tendencia a la alza del grupo DBS-on en relación a los otros grupos, que concuerdan con los datos encontrados referentes a la permanencia total en la zona central.



*Figura 7.* Efecto de la ECP en el número de entradas totales a la zona central en el OFT. La zona central fue dibujada en la imagen grabada usando el programa S. M. A. R. T., con el cual contabilizábamos el número de entradas a esta área delimitada. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. El OFT se realizó 48 horas después de la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=8-10 animales por grupo).

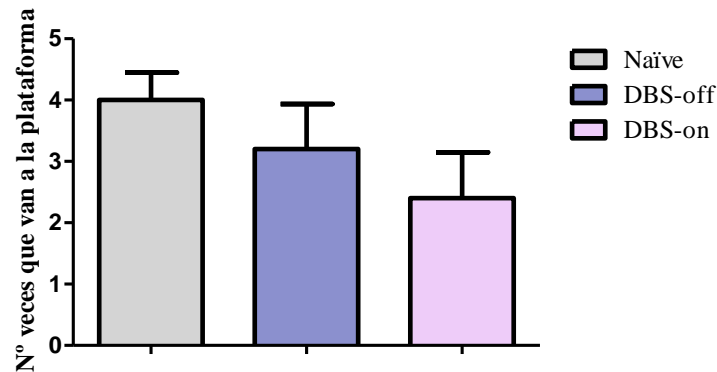
#### *Efecto de la ECP en el Novelty Supressed Feeding Test (NSFT)*

Tras comprobar que la ECP no produce alteraciones en la conducta ambulatoria y el grupo DBS-on permanece durante más tiempo en la zona central en el OFT, se utilizó el NSFT para evaluar el efecto ansiolítico de la ECP. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas ente los grupos de animales en la latencia de ingesta (ANOVA de una vía:  $F_{(2,15)} = 0.18$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 8).



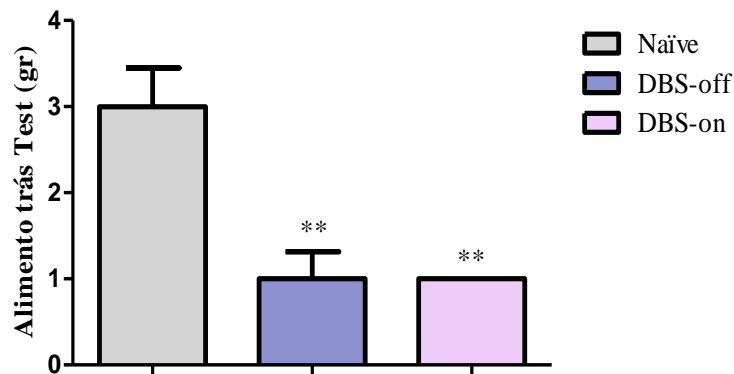
*Figura 8.* Efecto de la ECP en la latencia de ingesta de los animales en el NSFT. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió estimulación durante 4 horas el día previo y durante 2 horas justo antes del test. El NSFT fue realizado 48 horas después de la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=6-10 animales por grupo).

Asimismo, se analizó el número de veces que se acercaban los animales a la plataforma antes de comer para observar el grado de ansiedad que le producía estar en la zona central de la caja. Los resultados no muestran cambios significativos entre los grupos experimentales (ANOVA de una vía:  $F_{(2,15)} = 1.62$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 9), a pesar de que observamos una tendencia del grupo DBS-on a ir menos veces a la plataforma antes de comer.



*Figura 9.* Efecto de la ECP en el número de veces que los animales acuden a la plataforma antes de comer en el NSFT. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió 4 horas de estimulación el día previo y 2 horas justo antes del test. El NSFT se realizó 48 horas después de realizar la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=6-10 animales por grupo).

Por último, se evaluó la ingesta de comida tras el NSFT, ya que es de vital importancia que no existan diferencias significativas en la predisposición a comer de los diferentes grupos experimentales. Los resultados muestran diferencias significativas en la cantidad de comida que ingirieron los diferentes grupos experimentales (ANOVA de una vía:  $F_{(2,15)} = 12.19$ ,  $p < 0.01$ ; Figura 10).



*Figura 10.* Efecto de la ECP en los gramos de comida ingerida tras la realización del NSFT. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió 4 horas de estimulación el día previo y 2 horas justo antes del test. El NSFT se realizó 48 horas después de la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=6-10 animales por grupo). \*\*  $p < 0.01$ , vs. Naïve.

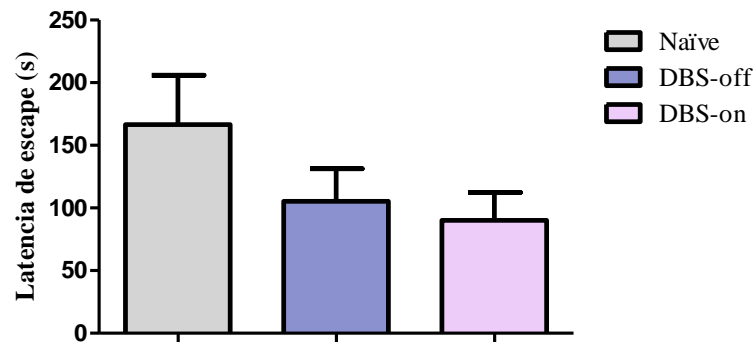
El test post hoc de Bonferroni mostró que no existían diferencias entre los grupos DBS-off y DBS-on ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, tanto los animales DBS-off ( $p < 0.01$ ) como DBS-on ( $p < 0.01$ ) mostraron una ingesta de comida significativamente menor que el grupo Naïve. Los gramos ingeridos por los animales que habían sido operados dos días antes de la prueba experimental equivalen proporcionalmente solo a un  $33,33\%$  de los comidos por el grupo Naïve.

Parece ser, junto a los datos de la latencia de ingesta y el número de veces que se va a la plataforma, que los animales DBS-on no muestran apetito en comparación con el grupo Naïve.

#### *Efecto de la ECP en el Home-Cage Emergence (HCE)*

A través de esta prueba, obtenemos medidas sobre el nivel de ansiedad de los animales con ECP en comparación con el grupo Naïve y DBS-off. Los resultados no muestran diferencias significativas en la latencia de escape en el HCE (ANOVA de una vía:  $F_{(2,29)} = 1.64$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 11). Sin embargo, podemos observar una tendencia que sugiere que los animales DBS-on tardan menos tiempo en salir de su caja, en comparación con el grupo Naïve. Los animales tratados con ECP tardaban un  $54.09\%$  menos en salir de la caja en comparación con el grupo Naïve.

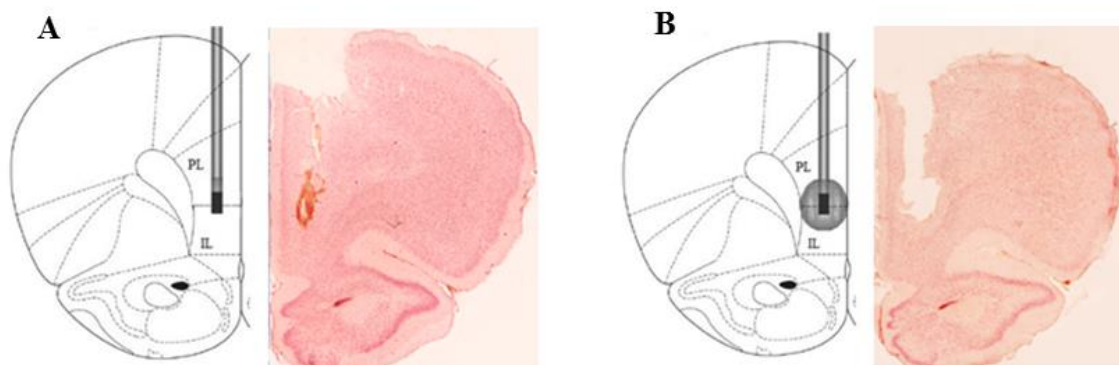




*Figura 11.* Efecto de la ECP en la latencia de escape en el HCE. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. DBS-on recibió 4 horas de estimulación el día previo y 2 horas justo antes del test. El HCE se realizó 48 horas tras la neurocirugía. Valores representados como media  $\pm$  EEM (n=12 animales por grupo).

### *Verificación histológica*

Los electrodos de estimulación fueron implantados en la corteza infralímbica (Figura 12). Los animales que no poseían los electrodos implantados en esta corteza, fueron descartados y sus resultados fueron omitidos de los análisis posteriores.



*Figura 12.* Imágenes representativas del área de implantación del grupo DBS-off (A) y del grupo DBS-on (B). Microfotografías a 4X de la sección de interés tras una tinción de Rojo Neutro. Los grupos de experimentación fueron: Naïve, animales no operados; DBS-off, animales operados que no recibieron ECP; DBS-on, animales operados que recibieron ECP. La localización del área infralímbica fue seleccionada según el Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1997).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### *Discusión*

El efecto antidepresivo de la ECP en la Cg25 en pacientes que no responden satisfactoriamente a los tratamientos de los que se dispone actualmente, ha sido demostrado en diversos ensayos clínicos (Mayberg et al., 2005; Lozano et al., 2008; Malone et al., 2009; Holtzheimer et al., 2012; Puigdemont et al., 2012; Bewernick et al., 2012; Bergfeld et al., 2016). A nivel preclínico, se ha observado que la ECP induce un efecto antidepresivo de la ECP en la corteza infralímbica en modelos animales (Hamani et al., 2010; Gersner et al., 2010; Rea et al., 2014; Hamani et al., 2014; Veerakumar et al., 2014; Edemann-Callesen et al., 2015; Jiménez-Sánchez et al., 2015; Lim et al., 2015a; Lim et al., 2015b; Etiévant et al., 2015; Bambico et al., 2015; Jiménez-Sánchez et al., 2016).

En la actualidad queda constatado el efecto antidepresivo de la ECP, por lo que las investigaciones se dirigen a evaluar la amplitud de su efecto terapéutico. Concretamente, está surgiendo un elevado interés por conocer cómo la ECP influye en el nivel de ansiedad, ya que la Depresión Mayor y los Trastornos de Ansiedad se presentan frecuentemente asociados (Clark y Watson, 1991; Agudelo, Buela-Casal y Spielberger, 2007). Esta comorbilidad afecta negativamente a la evolución del paciente, aún peor en los casos de DMR (Aragonès et al., 2009; Rush et al., 2005; McDermut et al., 2001).

El objetivo del estudio ha sido evaluar el posible efecto ansiolítico inducido por un protocolo corto de ECP, cuyo efecto antidepresivo ha sido previamente demostrado (Pérez-Caballero et al., 2014).

Para evaluar si la ECP modifica la actividad motora de los roedores a las 48 horas de la implantación de los electrodos se utilizó el test de campo abierto. Los resultados obtenidos indican que este abordaje no causa alteraciones en la actividad motora de los animales. Otros estudios realizados por diferentes grupos de investigación corroboran los resultados observados, ya que no han visto que la ECP induzca modificaciones en la actividad locomotora tras el tratamiento a pesar de que la duración evaluada varía entre los distintos experimentos (Hamani et al., 2010; Gersner et al., 2010; Hamani et al., 2014; Jiménez-Sánchez et al., 2015; Bambico et al., 2015; Lim et al., 2015b; Jiménez-Sánchez et al., 2016). Es más, la ECP no modifica la conducta ambulatoria de los animales ni en protocolos cortos de estimulación (e. g., Hamani et al., 2010; Hamani et al., 2014; Jiménez-Sánchez et al., 2015), ni en protocolos a largo plazo (e. g., Gersner et al., 2010; Lim et al., 2015b; Bambico

et al., 2015). Tampoco se ha observado diferencias en la actividad motora producto del tratamiento con ECP cuando previamente se ha inducido un modelo depresivo como es el *Chronic Unpredictable Stress*, (Gersner et al., 2010; Bambico et al., 2015; Lim et al., 2015b).

Además, el hecho de que la ECP no altere la actividad motora de los grupos de experimentación, nos indica que los parámetros evaluados en el NSFT y en el HCE no se van a encontrar alterados por la conducta ambulatoria.

Este test también se utiliza para evaluar ciertos comportamientos que pueden dar una medida de ansiedad o de emotividad en los animales (Leussis y Bolivar, 2006). El parámetro más evaluado con este fin es el nivel de tigmotaxis (se evalúa la preferencia de los roedores por pasar mayor tiempo explorando el perímetro de la caja que la zona central). En este estudio hemos evaluado el tiempo de permanencia en el área central del campo abierto, así como el número de entradas a esta zona. Si los animales permanecen un mayor tiempo en esta zona central de la caja, significa que presentan más conductas exploratorias del lugar nuevo y por tanto, un menor nivel de ansiedad (Radcliffe et al., 1998; Leussis y Bolivar, 2006). La exploración se produce durante los primeros 5 minutos y es considerado una medida de ansiedad de los animales ya que éstos no tenderán a inspeccionar el lugar si se encuentra con un estado ansioso elevado (Radcliffe et al., 1998; Leussis y Bolivar, 2006; Hamani et al., 2014).

En nuestro estudio, observamos como la actividad motora de los animales decae en el tiempo al exponerse a un entorno nuevo. Esto es producto de la etología de los roedores, conocido como el fenómeno de adaptación al ambiente (Radcliffe et al., 1998; Leussis y Bolivar, 2006). Asimismo, hemos encontrado que el grupo de animales tratados con ECP permanecían durante más tiempo en la zona central. De hecho, al analizar los primeros 5 minutos del OFT, la disminución de la tigmotaxis inducida por la ECP era aún mayor. Al igual que nuestros resultados, Lim et al. (2015b) demostraron que la ECP crónica era capaz de aumentar el tiempo de permanencia en la zona central en un modelo animal de depresión ampliamente utilizado, el modelo *Chronic Unpredictable Stress* (Lim et al., 2015b).

Otro de los parámetros que se han evaluado en el OFT es el número de entradas a la zona central. Los resultados obtenidos indican que la ECP tiende a aumentar el número de entradas en la zona central del test comportamental. Sin embargo, datos obtenidos por Gersner et al. (2010) indican que la ECP crónica no es capaz de aumentar el número de entradas en la zona central en el modelo *Chronic Unpredictable Stress* (Gersner et al., 2010).

Por tanto, la ECP a corto plazo parece inducir un aumento en el nivel de exploración de los animales expuesto a un entorno nuevo y por tanto, parece mostrar cierto efecto ansiolítico.

Tras observar que la ECP parece modificar los niveles de ansiedad en el OFT, decidimos realizar el NSFT con el fin de profundizar en el posible efecto ansiolítico inducido por la ECP. Esta segunda prueba evalúa el tiempo que tarda los animales en ir a la zona central de la caja para ingerir alimentos, por lo tanto una menor latencia se correlaciona con menores niveles de ansiedad. Los resultados del NSFT muestran que la ECP a corto plazo no modifica la latencia de ingesta de comida. Bambico et al. (2015) analizaron el efecto ansiolítico de la ECP crónica en animales con y sin modelo depresivo *Chronic Unpredictable Stress* y observaron que la ECP solo modificaba la latencia de ingesta en los animales sometidos al modelo de depresión (Bambico et al., 2015). Estos datos parecen ser contrarios a los obtenidos por otros autores que han observado una menor latencia para la ingesta de comida en los animales tratados con ECP, sugiriendo así un efecto ansiolítico (Hamani et al., 2010; Jiménez-Sánchez et al., 2015).

La discrepancia entre nuestros resultados y los mencionados anteriormente podría deberse al escaso tiempo de recuperación de los animales operados, ya que solo transcurrieron 48 horas entre la neurocirugía y el NSFT. La ingesta de comida evaluada tras la realización de este test comportamental se vio alterada en aquellos animales a los que se les había implantado los electrodos. La cirugía causó una menor ingesta en estos animales y es posible que la disminución del apetito alterara la latencia de ingesta en el NSFT. A raíz de estos resultados, se denota que un mayor tiempo post-quirúrgico de recuperación sería necesario con el fin de poder evaluar la ansiedad en este test comportamental.

Por ello se realizó otro test comportamental, el HCE, para esclarecer si la ECP a corto plazo produce efecto ansiolítico y poder comparar los resultados de las pruebas anteriores. Los resultados encontrados en el HCE indican que la ECP produce una ligera disminución en el tiempo de escape de los roedores. Por otro lado, Lim et al. (2015b) describen un contundente efecto ansiolítico en el HCE en animales tratados con ECP con o sin modelo depresivo *Chronic Unpredictable Stress* (Lim et al., 2015b). A pesar de no haber observado un claro efecto ansiolítico de la ECP a corto plazo en el HCE, parece que existe un efecto moderado. Es posible que sea necesario un tratamiento de mayor duración para que la ECP induzca un efecto ansiolítico significativo en este test comportamental.

Revisando la gran cantidad de estudio preclínicos dirigidos a evaluar el efecto ansiolítico de la ECP en la corteza infralímbica y los resultados obtenidos en esta investigación, podemos sugerir que la ECP a corto plazo disminuye los niveles de ansiedad de los animales experimentales, pero sin embargo, parece necesario un tratamiento a largo plazo para producir un efecto ansiolítico contundente. Sería necesario seguir investigando en esta línea para esclarecer el potencial efecto ansiolítico asociado a la ECP, ya que los datos aportados por distintos estudios parecen no ser unánimes (Gersner et al., 2010; Hamani et al., 2010; Rea et al., 2014; Hamani et al., 2014; Lim et al., 2015b; Bambico et al., 2015).

Futuras investigaciones en esta línea serían necesarias para profundizar en el efecto ansiolítico a corto plazo de la ECP empleando otros test comportamentales como el test del laberinto elevado en cruz, el test de luz-oscuridad o el paradigma de la evitación pasiva. El uso de estas pruebas podrían eliminar las dificultades encontradas en el NSFT, descartando así las posibles interferencias en el resultado debidas a la alteración en el apetito. Además del uso de otras pruebas, seguir investigando el mecanismo que subyace al efecto producido por el tratamiento de ECP sería de vital relevancia para los pacientes con DMR. Se ha demostrado la alta comorbilidad entre la Depresión Mayor y los Trastornos de Ansiedad (Clark y Watson, 1991; Agudelo, Buena-Casal y Spielberger, 2007), por lo que es necesario observar si la ECP a corto plazo no solo revierte la sintomatología depresiva, sino que también produce un efecto ansiolítico asociado, produciendo así la optimización del tratamiento de los pacientes resistentes.

#### *Interés científico-social y utilidad del estudio*

Estos resultados, junto a la literatura existente sobre el tratamiento de la ECP usando como zona diana la corteza infralímbica en animales y su área homóloga en humanos, la Cg25 (Gabbott et al., 2003; Takagishi y Chiba, 1991), demuestran que es una técnica con perspectiva futura a ser incluida como protocolo para los casos de DMR al tratamiento (Mayberg et al., 2005; Lozano et al., 2008; Malone et al., 2009; Holtzheimer et al., 2012; Puigdemont et al., 2012; Bewernick et al., 2012; Bergfeld et al., 2016). Al postularse como alternativa sólida para los casos resistentes, se hace necesario seguir realizando más estudios, tanto clínicos como preclínicos, para conocer el por qué la ECP es eficaz en casos donde no funcionan otros tratamientos. Además, el conocer el mecanismo de acción involucrado en la

técnica, nos permitirá optimizar el tratamiento de ECP en humanos, alcanzando así una mayor eficacia en la respuesta y remisión en los pacientes. A medida que avancen los medios tecnológicos y las investigaciones, podremos aclarar el enigma que encierra el mecanismo de acción de la ECP. Junto al conocimiento del mecanismo que subyace a la técnica, es necesario profundizar en los efectos de la misma, ya que su uso en pacientes con DMR es relativamente nuevo y aún estamos en una fase inicial de investigación.

Otro de los aspectos que han remarcado la ECP como tratamiento alternativo prometedor es el periodo en el que es eficaz la técnica. Se ha demostrado en estudios clínicos y preclínicos que incluso la ECP a corto plazo produce efecto antidepresivo (Puigdemont et al., 2012; Lozano et al., 2012; Holtzheimer et al., 2012; Hamani et al., 2014; Pérez-Caballero et al., 2014, Jiménez-Sánchez et al., 2015; Etiévant et al., 2015; Lim et al., 2015a; Jiménez-Sánchez et al., 2016). Esta rápida respuesta antidepresiva inducida por la ECP supone un beneficio añadido al tratamiento de la DMR, ya que estos pacientes presentan una mayor tendencia a conductas suicidas que pueden ser controladas cuando se observa una reducción de la sintomatología depresiva rápidamente (Ayuso-Mateos et al., 2012).

### *Limitaciones*

A pesar de la homología entre la corteza infralímbica en roedores y la Cg25 en humanos, los resultados obtenidos en estudios preclínicos no pueden ser extrapolables o comparados con estudios en humanos, aunque si son de utilidad para investigar la eficacia y los mecanismos que subyacen a la ECP.

Otra limitación que nos hemos encontrado ha sido el periodo post-quirúrgico, el cual ha podido influir en los resultados obtenidos en el NSFT. Por lo tanto, es necesario un mayor tiempo de recuperación para observar cómo influye la ECP al nivel de ansiedad de los animales de experimentación mediante el uso de este test comportamental.

Por último, mencionar que los protocolos usados, el periodo donde se realizan los test comportamentales y el protocolo de ECP en nuestro estudio son diferentes a otras investigaciones preclínicas y esto se debe tener en cuenta a la hora de realizar las comparaciones de los resultados observados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accolla, E. A., Aust, S., Merkl, A., Schneider, G. H., Kühn, A. A., Bajbouj, M. y Draganski, B. (2016). Deep brain stimulation of the posterior gyrus rectus region for treatment resistant depression. *Journal of affective disorders*, 194, 33-37.
- Agudelo, D., Buena-Casal, G. y Spielberger, C. D. (2007). Ansiedad y depresión: el problema de la diferenciación a través de los síntomas. *Salud Mental*, 30 (2), 33-41.
- Akhtar, H., Bukhari, F., Nazir, M., Anwar, M. N. y Shahzad, A. (2016). Therapeutic Efficacy of Neurostimulation for Depression: Techniques, Current Modalities, and Future Challenges. *Neuroscience Bulletin*, 32 (1), 115-126.
- Aragónès, E., Piñol, J. L. y Labad, A. (2009). Comorbilidad de la depresión mayor con otros trastornos mentales comunes en pacientes de atención primaria. *Atención Temprana/Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria*, 41 (10), 545-551.
- Ayuso-Mateos, J. L., Baca-García, E., Bobes, J., Giner, J., Giner, L., Pérez, V.,... y grupo RECOMS. (2012). Recomendaciones preventivas y manejo del comportamiento suicida en España. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*, 5 (1), 8-23.
- Bambinco, F. R., Bregman, T., Diwan, M., Li, J., Darvish-Ghane, S., Li, Z.,... y Hamani, C. (2015). Neuroplasticity-dependent and -independent mechanisms of chronic deep brain stimulation in stressed rats. *Translational Psychiatry*, 5, e674.
- Benabid, A. L., Koudsié, A., Pollak, P., Kahane, P., Chabardes, S., Hirsch, E.,... y Benazzouz, A. (2000). Future prospects of brain stimulation. *Neurological research*, 22 (3), 237-246.
- Benabid, A. L., Wallace, B., Mitrofanis, J., Xia, R., Piallat, B., Chabardes, S. y Berger, F. (2005). A putative generalized model of the effects and mechanism of action of high frequency electrical stimulation of the central nervous system. *Acta Neurológica Belgica*, 105 (3), 149-157.
- Bergfeld, I. O., Mantione, M., Hoogendoorn, M. L., Ruhé, H. G., Notten, P., van Laarhoven, J.,... y Denys, D. (2016). Deep Brain Stimulation of the Ventral Anterior Limb of the Internal Capsule for Treatment-Resistant Depression: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 73 (5), 456-464.
- Bewernick, B. H., Hurlmann, R., Matusch, A., Kayser, S., Grubert, C., Hadrysiewicz, B.,... y Schlaepfer, E. (2010). Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation Decreases Rating of Depression and Anxiety in Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, 67 (2), 110-116.
- Berwenick, B. H., Kayser, S., Sturm, V. y Schlaepfer, E. (2012). Long-Term Effects of Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation in Treatment-Resistant Depression: Evidence Sustained Efficacy. *Neuropsychopharmacology*, 37 (9), 1975-1985.
- Clark, L. y Watson D. (1991). Tripartite Model of Anxiety and Depression Psychometric Evidence and Taxonomic Implications. *Journal of Abnormal Psychology*, 100 (3), 316-336.

- Dostrovsky, J. O., Levy, R., Wu, J. P., Hutchison, W. D., Tasker, R. R. y Lozano, A. M. (2000). Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus pallidus. *Journal of Neurophysiology*, 84 (1), 570–574.
- Dougherty, D. D., Rezai, A. R., Carpenter, L. L., Howland, R. H., Bhati, M. T., O'Reardon, J. P.,... y Malone, D. A. (2014). A Randomized Sham-Controlled Trial of Deep Brain Stimulation of the Ventral Capsule/Ventral Striatum for Chronic Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, 78 (4), 240-248.
- Edemann-Callesen, H., Voget, M., Empl, L., Vogel, M., Wieske, F., Rummel, J.,... y Winter, C. (2015). Medial Forebrain Bundle Deep Brain Stimulation has Symptom-specific Anti-depressant Effects in Rats and as Opposed to Ventromedial Prefrontal Cortex Stimulation Interacts With the Reward System. *Brain Stimulation*, 8 (4), 714-723.
- Etiévant, A., Oosterhof, C., Bétry, C., Abrial, E., Novo-Perez, M., Rovera, R.,... y Haddjeri, N. (2015). Astroglial Control of the Antidepressant-Like Effects of Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation. *EBioMedicine*, 2 (8), 896-906.
- Gabbott, P. L., Warner, T. A., Jays, P.R. y Bacon, S. J. (2003). Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Research*, 993 (1-2), 59 –71.
- García, L., Audin, J., D'Alessandro, G., Bioulac, B. y Hammond, C. (2003). Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 (25), 8743–8751.
- Gersner, R., Toth, E., Isserles, M. y Zangen, A. (2010). Site-specific antidepressant effects of repeated subconvulsive electrical stimulation: potential role of brain-derived neurotrophic factor. *Biological Psychiatry*, 67 (2), 125-132.
- Hamani, C., Diwan, M., Macedo, C. E., Brandão, M. L., Shumake, J., Gonzalez-Lima, F.,... y Nobrega, J. N. (2010). Antidepressant-Like Effects of Medial Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation in Rats. *Biological Psychiatry*, 67 (2), 117-124.
- Hamani, C., Machado, D. C., Hipólido, D. C., Dubiela, F. P., Suchecki, D., Macedo, C. E.,... y Nobrega, J. N. (2012). Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biological Psychiatry*, 71 (1), 30-35.
- Hamani, C., Amorim, B. O., Wheeler, A. L., Diwan, M., Driesslein, K., Covolan, L.,... y Nobrega, J. N. (2014). Deep brain stimulation in rats: Different targets induce similar antidepressant-like effects but influence different circuits. *Neurobiology of Disease*, 71, 205-214.
- Hashimoto, T., Elder, C. M., Okun, M. S., Patrick, S. K. y Vitek, J. L. (2003). Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 (5), 1916–1923.



- Holtzheimer, P. E., Kelley, M. E., Gross, R. E., Filkowski, M. M., Garlow, S. J., Barrocas, A.,... y Mayberg, H. S. (2012). Subcallosal cingulate deep brain stimulation for treatment-resistant unipolar and bipolar depression. *Archives of general Psychiatry*, 69 (2), 150-158.
- Jiménez, F., Velasco, F., Salin-Pascual, R., Hernández, J. A., Velasco, M., Criales, J. L. y Nicolini, H. (2005). A patient with a resistant major depression disorder treated with deep brain stimulation in the inferior thalamic peduncle. *Neurosurgery*, 57 (3), 585-593.
- Jiménez-Sánchez, L., Castañé, A., Pérez-Caballero, L., Grifoll-Escoda, M., López-Gil, X., Campa, L.,... y Adell, A. (2015). Activation of AMPA Receptors Mediates the Antidepressant Action of Deep Brain Stimulation of the Infralimbic Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 26 (6), 2778-2789.
- Jiménez-Sánchez, L., Linge, R., Campa, L., Valdizán, E. M., Pazos, Á., Díaz, Á. y Adell, A. (2016). Behavioral, neurochemical and molecular changes after acute deep brain stimulation of the infralimbic prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, 108, 91-102.
- Kennedy S. H., Giacobbe P., Rizvi S.J., Placenza F.M., Nishilawa, Y., Mayberg, H. S. y Lozano, A. M. (2011). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: follow-up after 3 to 6 years. *American Journal of Psychiatry*, 168 (5), 502-510.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R. y Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. *Archives of General Psychiatry*, 62 (6), 593-602.
- Kopell, B. H., Grennberg, B. y Rezai, A. R. (2004). Deep brain stimulation for psychiatric disorders. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 21 (1), 51-67.
- Leussis, M. P. y Bolivar, V. J. (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology and genetics. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, 30 (7), 1045-1064.
- Lim, L. W., Janssen, M. L., Kocabicak, E. y Temel, Y. (2015a). The antidepressant effects of ventromedial prefrontal cortex stimulation is associated with neural activation in the medial part of the subthalamic nucleus. *Behavioural Brain Research*, 279, 17-21.
- Lim, L. W., Prickaerts, J., Hunguet, G., Kadar, E., Hartung, H., Sharp, T. y Temel, Y. (2015b). Electrical stimulation alleviates depressive-like behaviors of rats: investigation of brain targets and potential mechanisms. *Translational Psychiatry*, 5: e535.
- Lozano, A. M., Mayberg, H. S., Giacobbe, P., Hamani, C., Craddock, C. y Kennedy, S. H. (2008). Subcallosal Cingulate Gyrus Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, 64 (6), 461-467.
- Lozano, A. M., Giacobbe, P., Hamani, C., Rizvi, S. J., Kennedy, S. H., Kolivakis, T. T.,... y Mayberg, H. S. (2012). A multicenter pilot study of subcallosal cingulate area deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Journal of Neurosurgery*, 116 (2), 315-322.

- Malone, D. A., Dougherty, D. D., Rezai, A. R., Carpenter, L. L., Friehs, G. M., Eskandar, E. N.,... y Greenberg, B. D. (2009). Deep brain stimulation of the ventral capsule/ventral striatum for treatment-resistant depression. *Biological Psychiatry*, 65 (4), 267-275.
- Mayberg, H. S., Brannan, S. K., Mahurin, R. K., Jerabek, P. A., Brickman, J. S.,... y Fox, R. T. (1997). Cingulate function in depression: a potential predictor of treatment response. *Neuroreport*, 8 (4), 1057-1061.
- Mayberg, H. S., Liotti, M., Brannan, S. K., McGinnis, S., Mahurin, R. K., Jerabek, P. A.,... y Fox, P. T. (1999). Reciprocal Limbic-Cortical Function and Negative Mood: Converging PET Findings in Depression and Normal Sadness. *American Journal of Psychiatry*, 156 (5), 675-682.
- Mayberg, H. S., Lozano, A. M., Voon, V., McNeely, H. E., Seminowicz, D., Hamani, C.,... y Kennedy, S. H. (2005). Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Neuron*, 45 (5), 651-660.
- McDermut, W., Mattia, J. y Zimmerman, M. (2001). Comorbidity burden and its impact on psychosocial morbidity in depressed outpatients. *Journal of Affective Disorders*, 65 (3), 289-295.
- McIntyre, C. C., Grill, W. M., Sherman, D. L. y Thakor, N. V. (2004). Cellular effects of deep brain stimulation: model-based analysis of activation and inhibition. *Journal of Neurophysiology*, 91 (4), 1457-1469.
- Merkel, A., Schneider, G. H., Schönecker, T., Aust, S., Köhl, K. P., Kupsch, A.,... y Bajbouj, M. (2013). Antidepressant effects after short-term and chronic stimulation of the subgenual cingulate gyrus in treatment-resistant depression. *Experimental Neurology*, 249, 160-168.
- Miocinovic, S., Parent, M., Butson, C. R., Hahn, P. J., Russo, G. S., Vitek, J. L. y McIntyre, C. C. (2006). Computational analysis of subthalamic nucleus and lenticular fasciculus activation during therapeutic deep brain stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 96 (3), 1569-1580.
- Montgomery, E. y Baker, K. (2000). Mechanisms of deep-brain stimulation and future technical developments. *Neurological Research*, 22 (3), 259-66.
- Murray, C. J., López, A. D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden Of Disease Study. *Lancet*, 349 (9064), 1498-1504.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *La depresión*. [Online] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/es/> [Acceso el 27 de Mayo del 2016].
- Paxinos, G. y Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (3th Ed.). San Diego: Academic Press.
- Pérez-Caballero, L., Pérez-Egea, R., Romero-Grimaldi, C., Puigdemont, D., Molet, J., Caso, J. R.,... y Berrocoso, E. (2014). Early responses to deep brain stimulation in depression are modulated by anti-inflammatory drugs. *Molecular Psychiatry*, 19 (5), 607-614.
- Prosée, R. y Denys, D. (2015). Psychiatric Indications for Deep Brain Stimulation. En Reti, I. E. (Ed.). *Brain Stimulation: Methodologies and Interventions* (pp. 293-296). Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell.

- Puigdemont, D., Portella, M. J., Molet, J. y Pérez, V. (2012). Deep Brain Stimulation in Treatment-Resistant Depressive Disorders. En Sloan, A. G. y Montes-Villarreal, A. I. (Eds.). *Deep Brain Stimulation: New Developments, Procedures and Applications* (pp. 77-93). New York: Nova Science.
- Puigdemont, D., Pérez-Egea, R., Portella, M. J., Molet, J., de Diego-Adelino, J., Gironell, A.,... y Pérez, V. (2012). Deep brain stimulation of the subcallosal cingulate gyrus: further evidence in treatment-resistant major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15 (1), 121-133.
- Radcliffe, R. A., Jones, B. C. y Erwin, V. G. (1998). Mapping of provisional quantitative trait loci influencing temporal variation in locomotor activity in the LS<sub>SS</sub> recombinant inbred strains. *Behavior Genetics*, 28 (1), 39-47.
- Rea, E., Rummel, J., Schmidt, T. T., Hadar, R., Heinz, A., Mathé, A. A. y Winter, C. (2014). Anti-anhedonic effect of deep brain stimulation of the prefrontal cortex and the dopaminergic reward system in a genetic rat model of depression: an intracranial self-stimulation paradigm study. *Brain Stimulation*, 7 (1), 21-28.
- Roldán-Garrido, A. y Llanos-Méndez, A. (2010). *Estimulación cerebral profunda para el tratamiento de la depresión y del trastorno obsesivo compulsivo. Informe de síntesis de tecnología emergente*. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía.
- Rush, A. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Stewart, J. W., Warden, D.,... y Fava, M. (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*D report. *American Journal of Psychiatry*, 163 (11), 1905-1917.
- Rush, A. J., Zimmerman, M., Wisniewski, S. R., Fava, M., Hollon, S. D., Warden, D.,... y Trivedi, M. H. (2005). Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: demographic and clinical features. *Journal of Affective Disorders*, 87 (1), 43-55.
- Sartorius, A., Kiening, K. L., Kirsch, P., Von Gall, C. C., Haberkorn, U., Unterberg, A.,... y Meyer-Lindenberg, A. (2010). Remission of major depression under Deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biological Psychiatry*, 67 (2), e9-e11.
- Snyder, B. J., Hamani, C. y Lozano, A. M. (2009). Cingulate area 25 DBS for depression. En Bain, P., Aziz, T. y Liu, X. (Eds.). *Deep Brain Stimulation* (pp. 187-192). Oxford University Press.
- Takagishi, M. y Chiba, T. (1991). Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tracer PHA-L study. *Brain Research*, 566 (1-2), 26-39.
- Udupa, K. y Chen, R. (2015). The mechanisms of action of Deep brain stimulation and ideas for the future development. *Progress in Neurobiology*, 133, 27-49.
- Urbano, F. J., Leznik, E. y Llinas, R. R. (2002). Cortical activation patterns evoked by afferent axons stimuli at different frequencies: an in vitro voltage-sensitive dye imaging study. *Thalamus & Related Systems*, 1 (4), 371-378.

- Veerakumar, A., Challis, C., Gupta, P., Da, J., Upadhyay, A., Beck, S. G. y Berton, O. (2014). Antidepressant-like effects of cortical deep brain stimulation coincide with pro-neuroplastic adaptations of serotonin systems. *Biological Psychiatry*, 76 (3), 203-212.
- Wu, Y. R., Levy, R., Ashby, P., Tasker, R.R. y Dostrovsky, J. O. (2001). Does stimulation of the GPi control dyskinesia by activating inhibitory axons? *Movement Disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 16 (2), 208-216.